

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



B2

(51) 国際特許分類6 G01N 30/48, 30/54	A1	(11) 国際公開番号  (43) 国際公開日	WO99/61904 1999年12月2日(02.12.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02698		金澤秀子(KANAZAWA, Hideko)[JP/JP] 〒228-0802 神奈川県相模原市上鶴間2896-1-303 Kanagawa, (JP)	
(22) 国際出願日 1999年5月24日(24.05.99)		松島美一(MATSUSHIMA, Yoshikazu)[JP/JP] 〒210-0022 神奈川県川崎市川崎区池田2-3-21 Kanagawa, (JP)	
(30) 優先権データ 特願平10/140722 1998年5月22日(22.05.98) JP		(74) 代理人 弁理士 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)	
(71) 出願人 ; および (72) 発明者 岡野光夫(OKANO, Teruo)[JP/JP] 〒272-0827 千葉県市川市国府台6-12-12 Chiba, (JP)		(81) 指定国 CA, CN, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) アマシャム フアルマシア バイオテク株式会社 (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH K.K.)[JP/JP] 〒169-0073 東京都新宿区百人町3丁目25番1号 サンケンビルディング Tokyo, (JP)			
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 菊池明彦(KIKUCHI, Akihiko)[JP/JP] 〒169-0073 東京都新宿区百人町3-26-1-401 Tokyo, (JP)			
桜井靖久(SAKURAI, Yasuhisa)[JP/JP] 〒168-0064 東京都杉並区永福3-17-6 Tokyo, (JP)			

(54) Title: PACKING MATERIAL FOR CHROMATOGRAPHY HAVING NOVEL CHARACTERISTIC AND METHOD FOR ISOLATION OF SUBSTANCE USING THE SAME

(54) 発明の名称 新規な特性を有するクロマトグラフィー用充填剤およびそれを用いた物質の分離方法

(57) Abstract

A separation by chromatography using a packing material comprising an electrically charged copolymer is carried out in which a mobile phase is an aqueous phase and the effective charge density on the surface of a stationary phase can be changed by a physical stimulus. This method allows an efficient separation of biological components and the like, which may not be separated by ion exchange chromatography alone or reversed phase chromatography alone, without adversely affecting their activities.

(57)要約

移動相を水系に固定したままで、固定相表面の有効荷電密度を物理刺激によつて変化させることが可能である、荷電を有する共重合体を含む充填剤を用いてクロマトグラフィーによる分離を行う。この方法によれば、イオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーそれぞれ単独では分離できない生体成分等をその活性を損なうことなく効率的に分離することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

A E アラブ首長国連邦	D M ドミニカ	K Z カザフスタン	R U ロシア
A L アルバニア	E E エストニア	L C セントルシア	S D スーダン
A M アルメニア	E S スペイン	L I リヒテンシュタイン	S E スウェーデン
A T オーストリア	F I フィンランド	L K スリ・ランカ	S G シンガポール
A U オーストラリア	F R フランス	L R リベリア	S I スロヴェニア
A Z アゼルバイジャン	G A ガボン	L S レソト	S K スロヴァキア
B A ボスニア・ヘルツェゴビナ	G B 英国	L T リトアニア	S L シエラ・レオネ
B B バルバドス	G D グレナダ	L U ルクセンブルグ	S N セネガル
B F ベルギー	G E グルジア	L V ラトヴィア	S Z スウェーデン
B G ブルギナ・ファソ	G H ガーナ	M A モロッコ	T D チャード
B G ブルガリア	G M ガンビア	M C モナコ	T G トーゴー
B J ベナン	G N ギニア	M D モルドバ	T J タジキスタン
B R ブラジル	G W ギニア・ビサオ	M G マダガスカル	T Z タンザニア
B Y ベラルーシ	G R ギリシャ	M K マケドニア旧ユーゴスラヴィア	T M トルクメニスタン
C A カナダ	H R クロアチア	共 和 国	T R トルコ
C F 中央アフリカ	H U ハンガリー	M L マリ	T T トリニダッド・トバゴ
C G コンゴ	I D インドネシア	M N モンゴル	U A ウクライナ
C H スイス	I E アイルランド	M R モーリタニア	U G ウガンダ
C I コートジボアール	I L イスラエル	M W マラウイ	U S 米国
C M カメルーン	I N インド	M X メキシコ	U Z ウズベキスタン
C N 中国	I S アイスランド	N E ニジエール	V N ヴィエトナム
C R コスタ・リカ	I T イタリア	N L オランダ	Y U ユーゴースラビア
C U キューバ	J P 日本	N O ノールウェー	Z A 南アフリカ共和国
C Y キプロス	K E ケニア	N Z ニュー・ジーランド	Z W ジンバブエ
C Z チェコ	K G キルギスタン	P L ポーランド	
D E ドイツ	K P 北朝鮮	P T ポルトガル	
D K デンマーク	K R 韓国	R O ルーマニア	

## 明細書

新規な特性を有するクロマトグラフィー用充填剤  
およびそれを用いた物質の分離方法5 技術分野

本発明は、水系で固定相表面の有効荷電密度あるいは親水性／疎水性のバランスを外的信号（例えば、温度）によって変化させることが可能である、荷電を有する重合体あるいは共重合体を含む充填剤およびそれを用いて金属元素、医薬品、および生体成分などの物質をクロマトグラフィーにより分離する物質の新規  
10 な分離方法に関する。

背景技術

液体クロマトグラフィーは固定相と移動相との組み合わせや分離にあずかる相互作用の様式により多種多様である。液体クロマトグラフィーは金属元素の分離、  
15 医薬品の分離精製、生化学分野のペプチドや蛋白質、核酸などの分離に重要である。さらには最近進歩の著しい遺伝子工学手法により生産される組換え蛋白質などのバイオ医薬への応用が盛んになるにつれ、これらの分離精製のための効率的な分離法の要求がさらに強まりつつある。現在広く用いられているクロマトグラ  
20 フィーとして、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等がある。

イオン交換クロマトグラフィーは不溶性保持担体表面の電解質を固定相として移動相中に存在する対イオンを可逆的に吸着することにより分離を行う。保持担体にはシリカ、セルロースやデキストラン、スチレンとジビニルベンゼンとの共重合体などが多く用いられている。これら担体にスルホン酸基、四級アンモニウム基などのイオン交換基を導入したものをイオン交換体として市販されている。  
25 溶液中の水素イオン濃度に応じて溶質はカチオン、アニオン、両性イオンに解離し、この溶液をイオン交換カラムに流した時担体表面の逆電荷の交換基に溶媒イオンと競合して結合し、溶液とイオン交換体表面の間に一定の割合で分配する。この結合の強さによりカラム内を移動する速度が異なることを利用して分離する。

この分配はいくつかの方法により変化させることができる。例えば、移動相中の競合するイオン種の濃度により、変化させることができる。また、溶液の水素イオン濃度を変化させ、担体表面のイオン交換基のイオン化の割合を変化させる。したがって、イオン交換クロマトグラフィーでは移動相のイオン強度や水素イオン濃度を調節して溶質の順序を変化させ分離することが一般的に行われている。

また、逆相クロマトグラフィーでは疎水性の固定相と極性の移動相から成り立っている。溶質はその疎水性度に応じて移動相と固定相との間で分配され分離される。これらの場合にも移動相の溶媒の疎水性度を変化させ移動相と固定相との間の分配を変化させ溶出している。また、移動相の溶媒には有機溶媒を用いるために分離対象になる生体成分の活性を損なう恐れがある。

いずれにしてもイオン交換クロマトグラフィーでも、逆相クロマトグラフィーでも基本的には移動相の溶媒を様々に変化させて溶出分離を行っている。溶出に用いている溶媒の酸や有機溶媒により、目的のサンプルの活性を損なう可能性がある。

また、一つの担体で一つのクロマトグラフィーのモードを採用しているために、それぞれのクロマトグラフィーで分離を行う場合にはそれぞれ別々の操作でクロマトグラフィーを別々に行う必要がある。これらの問題を解決するために 1 種類の担体でしかも 1 種類の物理刺激でイオン交換クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーを行い得る担体を開発することにより、短時間で効率よい分離が可能となり、従来分離し得ないものも分離可能になる。

また、生体成分には電荷を持たないものや持つものなど多種多様である。一般に、イオン化する化合物は、イオン化していない状態では疎水性充填剤に対して疎水性相互作用によって保持される。しかしイオン化されると疎水性充填剤に対して疎水性相互作用は弱まる。イオン解離性化合物の解離定数に差がある場合の分離は、イオン交換体を用いることによりイオン-イオン相互作用によって容易に行うことができる。

一般に、塩基性のタンパク質の分離には弱酸性のイオン交換樹脂が、酸性のタンパク質の分離には弱塩基性のイオン交換樹脂が適していることが知られている。このようにイオン交換性の置換基を導入することにより、イオン-イオン相互作

用による分離により、疎水性が同程度で分子量に差がなく疎水性相互作用のみでは分離が困難な化合物およびタンパク質や核酸オリゴマーなどの生体分子などの多くの物質への応用が広がることが期待できる。

しかしながら、1種類の担体でしかも1種類の物理刺激でイオン交換クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーを行い得る担体や疎水性が同程度で分子量に差がなく疎水性相互作用のみでは分離が困難な化合物およびタンパク質や核酸オリゴマーなどの生体分子などの多くの物質を効率的に分離することが可能な担体はこれまで存在しなかった。

## 10 発明の開示

そこで、本発明者らは上記の課題を解決すべく種々の観点から検討および開発を行った。その結果、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) に正電荷を持つジメチルアミノプロピルアクリルアミド (DMA PAAm) を共重合させることでイオン交換機能をもった新しい充填剤を作製し、これを用いて温度によるコントロールを行えば逆相クロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーの双方を行い得ることを見いだした。また、共重合体に電荷を持つものを用いたことでポリマーのL C S T をpHによってもコントロールできることを見いだした。本発明はかかる知見に基づいて完成したものである。

本発明は、移動相を水系に固定したままで、固定相表面の有効荷電密度を外的刺激によって変化させることができ、荷電を有する重合体あるいは共重合体を含む充填剤を用いてクロマトグラフィーによる分離を行うことを特徴とする物質の分離方法に関する。

また、本発明は、アミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミドの共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤よりなる固定相に物質を保持させた後、外部温度を段階的に変化させる温度グレーディエント法により固定相表面の親水性／疎水性のバランスを変化させ、同一の移動相を通過させることによって物質を分離することを特徴とする物質の分離方法に関する。

さらに、本発明は、固定相表面の有効荷電密度を物理刺激によって変化させる

ことが可能である、荷電を有する共重合体を含むクロマトグラフィー用充填剤に関する。

本発明のクロマトグラフィー用充填剤は、固定相の表面構造を温度などの外的な物理刺激で変化させることにより、担体表面に存在するイオン交換基の荷電状態を可逆的に制御しうる。すなわち、本発明は、単一の水系溶媒である移動相（水系移動相）によって、2つのモード、即ちイオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーを同時に得る固定相を提供するものであり、しかもイオン交換クロマトグラフィーのモードにおいては担体表面のイオン交換基の荷電を、逆相クロマトグラフィーでは親水性／疎水性のバランスを自由に制御が可能な担体を提供するものである。なお、ここでいう水系溶媒とは水のみ、あるいは無機塩類を含む水溶液であって、有機溶媒を含まないものを意味する。

本発明は移動相を水系に固定したまま、固定相の表面のイオン交換基周辺の物性や構造を物理刺激により、制御して表面のイオン交換基の電荷を調節することによって分離を行うことを特徴とする分離精製担体を提供するものである。即ち、本発明によれば、外部温度を臨界温度以下ではイオン交換基が担体表面に表出し、分離する生体成分はイオン交換基との相互作用し、イオン交換クロマトグラフィーのモードで分離する。外部温度が臨界温度以上では表面に荷電が弱まり、疎水性が増大し、逆相クロマトグラフィーのモードで分離が可能になる。外部温度により担体表面の親水性／疎水性バランスを可逆的に自由に変化することが可能となる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例2に記載された2種類の充填剤を用いてアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分離した場合の温度と保持時間の関係を示すグラフである。

図2は、実施例3においてpHを変えてアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分離した場合の温度と保持時間の関係を示すグラフである。

図3は、実施例4においてイオン強度を変えてアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分離した場合の温度と保持時間の関係を示すグラフで

ある。

図4は、実施例5においてIPAAMとDMAPAAMの重合比率を変えてアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分離した場合の温度と保持時間の関係を示すグラフである。

5

### 発明を実施するための最良の形態

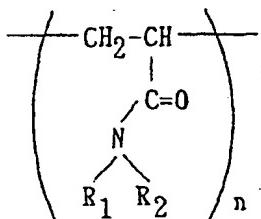
本発明の方法における外的な物理信号とは、例えば温度変化である。温度変化により、充填剤表面のイオン交換基周辺の物性や構造を変化させることは、例えば担体表面に温度応答性ポリマーを導入することで達成される。このような充填剤は、例えば、担体表面を、側鎖あるいは末端にアミノ基、カルボキシル基、あるいは水酸基等を有するアルキルアクリルアミド重合体あるいはその共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤が挙げられる。化学修飾した充填剤には、例えばシリカ担体に前記のアルキルアクリルアミド重合体あるいはその共重合体で修飾したものを持げることが出来る。また、イオン交換基の導入には前記のアルキルアクリルアミドとアミノ基やカルボキシル基を有するコモノマーとの共重合体で化学修飾することで得られる。

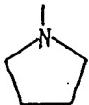
アミノ基を有するポリマーの構成単位としてジアルキルアミノアルキル(メタ)アクリルアミド、ジアルキルアミノアルキル(メタ)アクリレート、アミノアルキル(メタ)アクリレート、アミノスチレン、アミノアルキルスチレン、アミノアルキル(メタ)アクリルアミド、アルキルオキシアルキルトリメチルアンモニウム塩、(メタ)アクリルアミドアルキルトリメチルアンモニウム塩等が挙げられる。また、カルボキシル基を有するポリマーの構成単位としてアクリル酸、メタクリル酸、スルホン酸を有するポリマーの構成単位として(メタ)アクリルアミドアルキルスルホン酸等が挙げられる。

本発明の方法において使用するポリアルキルアクリルアミドとしては、下記に示すポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、ポリジエチルアクリルアミド、ポリ(N-プロピルアクリルアミド)およびポリアクリロイルピロリジンのいずれか一種、或いはこれらのポリマーの構成単位とアルキルアクリレートもしくはアルキルメタクリレートとの共重合体が望ましい。

化学式 1

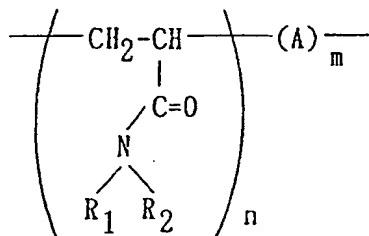
ポリーアルキルアクリルアミド



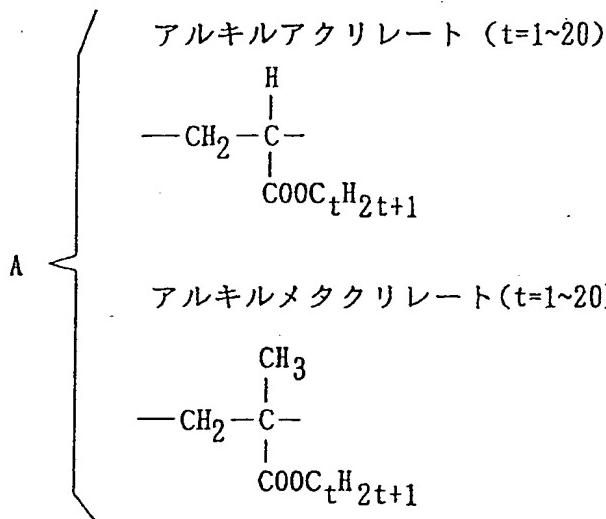
	$\text{R}_1$	$\text{R}_2$	略号
ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)	-H	$-\text{CH}\begin{pmatrix} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 \end{pmatrix}$	ポリ(IPAAm)
ポリ(N,N'-ジエチルアクリルアミド)	$-\text{C}_2\text{H}_5$	$-\text{C}_2\text{H}_5$	ポリ(DEAAm)
ポリ(アクリロイルピロリジン)			ポリ(APy)
ポリ(N-プロピルアクリルアミド)	-H	$-\text{C}_3\text{H}_7$	ポリ(PAAm)

化学式 2

## 共重合体



A : 50~60%含有



ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) は32℃に下限臨界温度を有するので、該分子で化学修飾した担体はこの臨界温度で親水性／疎水性の表面物性を大きく変化させるため、これをクロマトグラフィーの充填剤の表面にグラフトもしくはコーティングして使用した場合、試料に対する保持力が温度によって変化させられる結果溶出液の組成を変化させずに保持挙動を温度によってコントロールすることが可能である。下限臨界温度を32℃以上にするためには、イソプロピルアクリルアミドよりも親水性のモノマーであるアクリルアミド、メタクリル酸、アクリル酸、ジメチルアクリルアミド、ビニルピロリドンなどの親水性のコモノマーをN-イソプロピルアクリルアミドと共に重合させることによって調整することが可能である。また、下限臨界温度を32℃以下にしたいときは、疎水性モノ

マーであるスチレン、アルキルメタクリレート、アルキルアクリレートなどの疎水性のコモノマーとの共重合によって調整することができる。

また、ポリジエチルアクリルアミドの下限臨界温度は、約30℃～32℃であ  
り、この温度を境として親水性／疎水性に表面物性が変化し、前述のポリ（N-

5 イソプロピルアクリルアミド）の場合と同様に、試料に対する保持力を温度によ  
って調整することができる。本発明で利用される新規なクロマトグラフィー用担  
体は、化学修飾或いは高分子のコーティングによって作製される。化学修飾手段  
としては表面グラフト法とラジカル重合の2つの方法を用いることができる。ま  
たコーティング方法としては、適用温度範囲内で不溶とした後、不溶なものをコ  
10 ーティングする。

上記したように、温度応答性高分子を担体へ導入するための化学修飾法は表面  
グラフト法とラジカル重合法を用いることができる。表面グラフト法は一定の大  
きさの温度応答性高分子を始めに合成して、担体に接合する方法であるのに対し  
て、ラジカル重合法では担体表面上でモノマーから重合させ高分子を構築する方  
15 法である。表面グラフト法に比較し、担体表面に密に温度応答性高分子を導入す  
ることが可能である。担体表面の疎水性度を増大させ、保持時間をコントロール  
しやすくなる。また、担体表面でのシリカゲルとの相互作用による非特異的吸着  
を抑えることができる。

本発明の分離方法によって分離することができる物質としては、金属元素（例  
20 えば、Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>等）、医薬品（例えば、ステロイド化合物、解熱鎮痛剤等）、  
生体成分（例えば、ペプチド、タンパク質、核酸等）等が挙げられる。特に、イ  
オン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーそれぞれ単独では分離す  
ることのできない種々の生体成分の分離に有効である。

## 25 実施例

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれによって  
何ら限定されるものではない。

### 実施例1

### 1. ポリマーの合成

1-1) ポリ (IPAAm-DMAPAAm) (DMAPAAm: N, N-ジメチルアミノプロピルアクリルアミド)

#### 1-1-a) カルボキシル末端基を持つIPAAm共重合体の作製

5 カルボキシル末端基を持つIPAAm共重合体を分子量4000を目安として合成した。ここで共重合体の分子量は、連鎖移動剤である3-メルカプトプロピオン酸(MPA)の量によって設定することができる。分子量4000の共重合体を作製するには、モル比でMPA / (IPAAm + DMAPAAm) = 0.028となるようにMPAの量を調整した。

10 精製モノマー IPAAM: 25.0 g

カチオン性モノマー IPAAMに対しモル比でDMAPAAm 5% : 1.72 g

ラジカル開始剤 2, 2'-アゾビス(イソブチロニトリル) (AIBN) : 0.145 g

15 連鎖移動剤 (3-メルカプトプロピオン酸) 0.691 g

DMF (N, N-ジメチルホルムアミド) 50 ml

上表にある物質を重合管に入れ、三方活栓を取り付け輪ゴムで固定した。そして、コックを閉じた状態で重合管を液体窒素中に入れ完全に凍結させ、次にコックを開いて真空ポンプを用いて脱気した。次に再びコックを閉じて重合管をメタノール中に入れ管内のサンプルを完全に溶解させた。この操作を3回繰り返した(凍結融解脱気法)。このように、充分脱気したサンプルで減圧状態になっている重合管を70℃の振とう恒温槽に入れ、2時間ラジカル重合反応させ片末端にカルボキシル基を持つ共重合体を合成した。反応後、室温になるまで放置し、溶媒(DMF)を40℃で減圧蒸留し濃縮し、残留物を氷冷したジエチルエーテルに滴下しポリマーを得た。得たポリマーを濾取し、常温で一晩減圧乾燥し、その乾燥物をアセトンに溶かし再びジエチルエーテルで精製した。これによって得たポリマーを再び濾取しこれを常温で一晩減圧乾燥した。ここで得たポリマーを5% (w/v) の溶液になるように精製水にとかした。これを分画分子量500の透析膜に移し3日間透析を行った。これによって、分子量のそろった純度の高

い共重合体を得た。

1 - 1 - b) I P A A m 共重合体の担体への導入

(a) 活性エステル（スクシニル）化法

合成した共重合体をスクシニル化するにあたり、モル比で合成共重合体 : N,

5 N' - 亜シクロヘキシカルボジイミド (N, N' - D i c y c l o h e x y l  
c a r b o d i i m i d e (DCC)) : N - ヒドロキシスクシンイミド (N -  
H y d r o x y s u c c i n i m i d e) = 1 : 2. 5 : 2 の割合になるように  
調整した。

ナス型コルペンに合成共重合体を入れ、半量の酢酸エチル (2 5 ~ 3 0 mL)

10 で溶かした後 N - ヒドロキシスクシンイミドと D C C を加え残りの酢酸エチルを  
加え溶かした。次に 4 ℃ の氷水に浸し 2 時間スターラーで攪拌し、後に 2 5 ℃ に  
設定した恒温槽に入れて一晩攪拌した。溶液を濾過し、副生成物であるジシクロ  
ヘキシル尿素を取り除き、減圧下で濃縮した。最後にジエチルエーテルで精製し、  
生成物を濾取・減圧乾燥して得られたスクシニル化共重合体を冷凍庫に保存した。

15 1 - 1 - c) 担体（シリカゲル）への導入

スクシニル化した共重合体を、溶媒に 1, 4 - ジオキサンを用いて、3 回に分  
けてアミノプロピルシリカゲルと反応させた。反応温度は室温 (2 5 ℃) で行つ  
た。まずスクシニル化ポリマー (1. 0 g) を 1, 4 - ジオキサン (5 0 mL)  
に溶かし、振とう恒温槽中でアミノプロピルシリカゲル (3 g) と一晩反応させ  
た。次に反応液を濾取したものと、新たな共重合体 (1. 0 g) を再び 1, 4 -  
ジオキサン (5 0 mL) に溶かし一晩反応させた。この操作をもう一度繰り返し  
たり最後に濾取したものを、メタノール (5 0 0 mL) 、蒸留水 (2 L) で十分  
洗浄し、これを充填剤として減圧乾燥してデシケーターに保存した。

25 実施例 2

1 - 2) P I P A A m ハイドロゲル表面の作製

1 - 2 - a) アミノプロピルシリカゲル表面へのゲル層の形成

はじめにアミノプロピルシリカゲルへ重合開始剤を導入するために下記の化合  
物を使用した。

アミノプロピルシリカゲル 5 g  
 V-501 3.5 g (12.5 mmol)  
 EEDQ 6.18 g (25.0 mmol)  
 DMF 50 ml

5 上述の量でV-501 [4,4'-アゾビス(4-シアノバレリン酸(4,4'-azobis(4-cyanovaleic acid)) (分子量: 280・28)] を重合開始剤、EEDQ [N-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリン(N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline) (分子量: 247,30)]  
 10 を縮合剤として使用し、これらとアミノプロピルシリカゲルをDMF中で反応させた。これを遮光下で30分間N<sub>2</sub>(窒素)ガスでバーリングしその後完全にN<sub>2</sub>置換し、N<sub>2</sub>風船をつけて室温で6時間反応させた。反応後ろ過してからDMFで洗浄した。これにより表面に重合開始剤を導入した。

### 1-2-b) 表面ゲル層の形成

15 1-2-aで作製したV-501結合シリカゲル 4 g  
 IPAAm 10 g  
 BIS 0.27 g  
 EtOH 200 ml  
 DMA PAAm IPAAmに対してモル比で8:2あるいは9:1になる量を添加した。

シリカゲル、IPAAm、DMA PAAm、BIS [N,N'-メチレンービス(アクリルアミド)(N,N'-Methylene-bis(acrylamide)) (分子量: 154,17)] をエタノールに溶解させた。これを遮光下で1時間N<sub>2</sub>バーリングしその後完全にN<sub>2</sub>置換し、N<sub>2</sub>風船をつけて70℃(油浴)で5時間反応させた。これによりPIPAAm表面のゲル層を形成した。反応後ろ過したしてからメタノールと水で洗浄した。これを充填剤として減圧乾燥してデシケーターに保存した。これをステンレスカラムに充填して分析に用いた。

### 実施例3

正電荷ゲル (I P A A m : D M A P A A m = 8 : 2) と I P A A m ハイドロゲルを充填したカラムを用いて、下記の分離条件でアスピリン (A s p i r i n) 、サリチル酸 (s a l i c y l i c a c i d) 、サリチル酸メチル (m e t h y l s a l i c y l a t e) 、安息香酸 (b e n z o i c a c i d) を分離した。

5

#### 分離条件

カラム：(1) ポリ (I P A A m) ハイドロゲル修飾シリカ充填カラム

(2) ポリ (I P A A m - c o - D M A P A A m) (8 : 2) ハイドロゲル修飾シリカ充填カラム

10 緩衝液 : N a<sub>2</sub> C O<sub>3</sub> / N a H C O<sub>3</sub>

p H = 9. 0

イオン強度 = 0. 1 M

結果を図 1 に示す。I P A A m ハイドロゲルを充填したカラムではアスピリンと安息香酸が分離出来ないが、正電荷ゲル (I P A A m : D M A P A A m = 8 :

15 2) を充填したカラムではこれらの化合物の分離が可能となった。特に 10 ℃ で

は荷電性物質および非荷電物質を含む 4 種すべての分離が 20 分程度の短時間で可能となった。分離順序はこれらの化合物の疎水性度に依存している。また温度上昇に伴い、保持時間 (r e t e n t i o n t i m e) がサリチル酸と安息香酸では減少した。これは、温度上昇により温度応答性ポリマーの構造および物性

20 が変化し、担体表面の荷電が減少して表面と溶質との相互作用が減少したことによるものと考えられる。電荷をもたないサリチル酸メチルでは逆に保持時間が上昇している。これは温度上昇により温度応答性ポリマーが疎水性に変化したためによると考えられる。

25 実施例 4 : p H の変化による影響

実施例 3 のポリ (I P A A m - c o - D M A P A A m) (8 : 2) ハイドロゲル修飾シリカ充填カラムを用いて、緩衝液として N a H P O<sub>4</sub> / H<sub>3</sub> C<sub>6</sub> H<sub>5</sub> O<sub>7</sub> (クエン酸・H<sub>2</sub>O (一水和物)) を用い、p H = 7. 0とした以外は実施例 3 と同じ方法によりアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分離した。結

果を図2に示す。

図2から、pH 9.0に比べてpH 7.0ではすべての物質において保持時間が増大したことがわかる。これはアニオン性化合物はpH 7.0でより正荷電を有する担体表面と強く相互作用するためと考えられる。したがって、pHにより分離する物質の保持時間を調節することが可能であることが示された。

#### 実施例5：イオン強度による影響

実施例3のポリ(IPAAm-co-DMAPAAm) (8:2) ハイドロゲル修飾シリカ充填カラムを用いて、下記の分離条件でアスピリン、サリチル酸、

10 サリチル酸メチル、安息香酸を分離した。

#### 分離条件

緩衝液: NaHPO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>

pH = 7.0

イオン強度 = 1.0M および 0.1M

15 結果を図3に示す。イオン強度の増大 (0.1M → 1.0M) により、電荷をもたないサリチル酸メチルを除くすべてにおいて、保持時間は減少し、サリチル酸メチルでは保持時間が増大した。イオン強度の増大により、担体表面のアミノ基のプロトン化が抑制され、正荷電が減少したために、アニオン性化合物との相互作用が弱くなったためと考えられる。サリチル酸メチルではイオン強度の増大にともなって担体表面の疎水性度が増大し、疎水性相互作用が強くなつたためと考えられる。

#### 実施例6：IPAAmとDMAPAAmの重合比率による影響

下記の分離条件でアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分

25 離した。

#### 分離条件

カラム: (1) ポリ(IPAAm-co-DMAPAAm) (9:1) ハイドロゲル修飾シリカ充填カラム

(2) ポリ(IPAAm-co-DMAPAAm) (8:2) ハイドロ

## ゲル修飾シリカ充填カラム

緩衝液: NaHPO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>

pH = 7.0

イオン強度 = 0.1 M

5 結果を図4に示す。正荷電性のポリマーの増大により保持時間は増大した。この結果から、重合比率の変化により保持時間が調整可能であることがわかる。

## 産業上の利用の可能性

本発明は下記に示す利点を有する。

- 10 1) 担体表面に表出しているイオン交換体の荷電量を温度で自由に調節し、移動相の溶媒を変化させずに、単一の水系の移動相で分離が可能である。
- 2) 一回の操作で溶質の疎水性およびイオン性の違いにより、分離が可能である。2回の分離操作が1回で済み、効率的であり、回収率が向上する。
- 3) イオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーそれぞれ単独で15 は分離できない生体成分の分離が可能になる
- 4) 酸や有機溶媒を用いずに分離し、生体成分の活性を損なうことなく分離が可能になる。
- 5) 充填剤の再生が従来のイオン交換体に比べ速やかに行うことが出来る。

## 請求の範囲

1. 移動相を水系に固定したままで、固定相表面の有効荷電密度を物理刺激によって変化させることができある、荷電を有する重合体あるいは共重合体を含む充填剤を用いてクロマトグラフィーによる分離を行うことを特徴とする物質の分離方法。  
5
2. 物理刺激が温度変化である請求項 1 記載の分離方法。
3. 充填剤が、担体表面に温度応答性高分子で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤である請求項 2 記載の分離方法。
- 10 4. 充填剤が、ラジカル重合法を用いて温度応答性高分子で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤である請求項 3 記載の分離方法。
5. 温度応答性高分子が、担体表面を側鎖あるいは末端にアミノ基、カルボキシル基、あるいは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミドの重合体および共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤である請求項 3 または 4 記載の分離方法。  
15
6. ポリアルキルアクリルアミドが、ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド)、ポリ (N-プロピルアクリルアミド)、ポリジエチルアクリルアミドまたはポリアクリロイルピロリジンのいずれか一種である請求項 5 記載の分離方法。
7. 物質が金属元素、医薬品、および生体成分から選択される請求項 1 ないし  
20 6 のいずれか 1 項記載の分離方法。
8. アミノ基、カルボキシル基、あるいは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミドの共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤よりなる固定相に物質を保持させた後、外部温度を段階的に変化させる温度グラディエント法により固定相表面の親水性／疎水性のバランスを変化させ、同一の移動相を通過させることによって物質を分離することを特徴とする物質の分離方法。  
25
9. 移動相が水系溶媒である請求項 8 記載の分離方法。
10. ポリアルキルアクリルアミドが、ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド)、ポリ (N-プロピルアクリルアミド)、ポリジエチルアクリルアミドまたはポリアクリロイルピロリジンのいずれか一種である請求項 8 または 9 のいずれ

か 1 項記載の分離方法。

11. 物質が金属元素、医薬品、および生体成分から選択される請求項 8 ない  
し 10 のいずれか 1 項記載の分離方法。

12. 固定相表面の有効荷電密度を物理刺激によって変化させることが可能で  
5 ある、荷電を有する重合体あるいは共重合体を含むクロマトグラフィー用充填剤。

13. 重合体あるいは共重合体がアミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等  
を有するポリアルキルアクリルアミドの共重合体である請求項 12 記載のクロマ  
トグラフィー用充填剤。

14. ポリアルキルアクリルアミドが、ポリ (N-イソプロピルアクリルアミ  
10 ド)、ポリ (N-プロピルアクリルアミド)、ポリジエチルアクリルアミドまたは  
ポリアクリロイルピロリジンのいずれか一種である請求項 12 または 13 記載  
のクロマトグラフィー用充填剤。

図 1

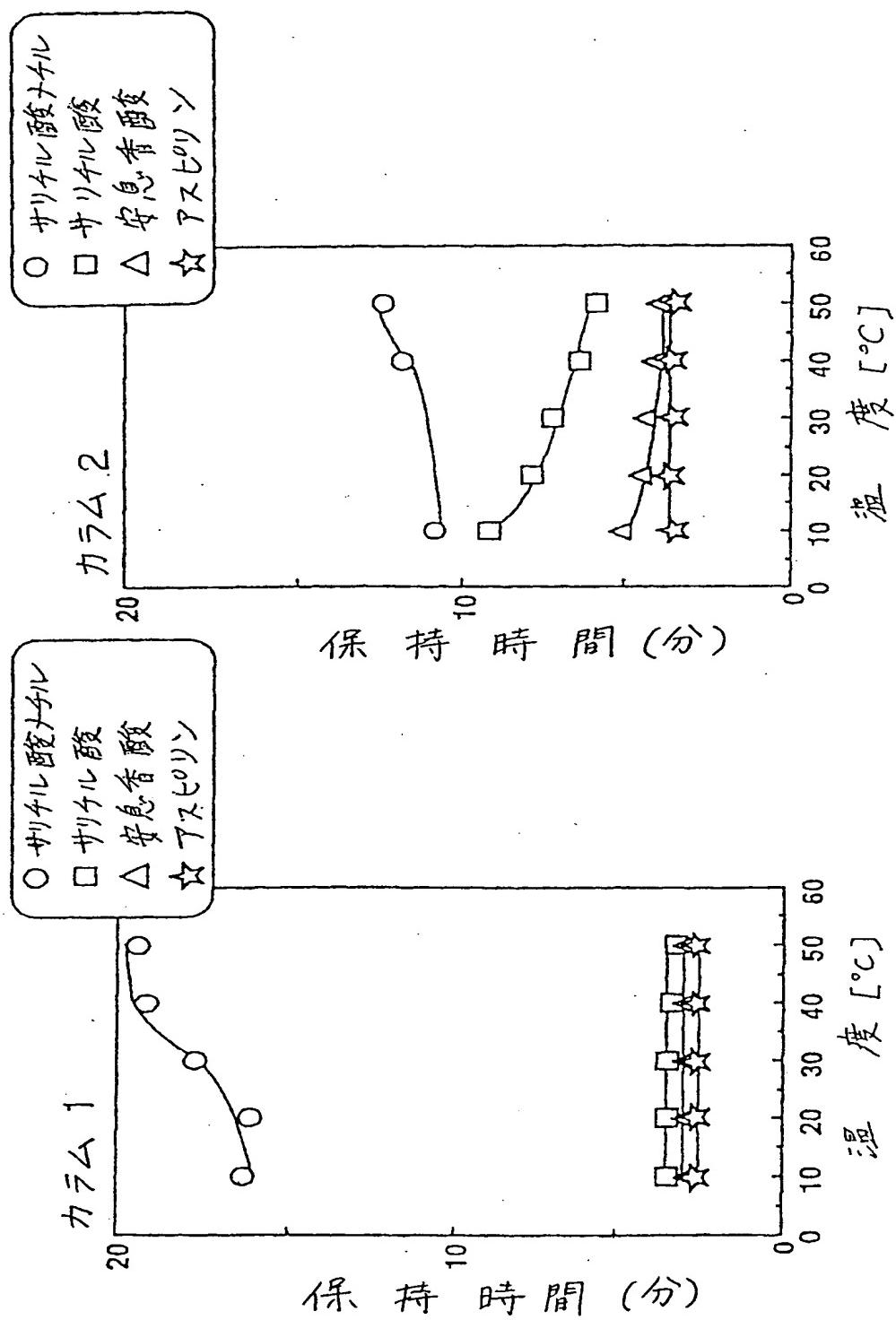


図 N

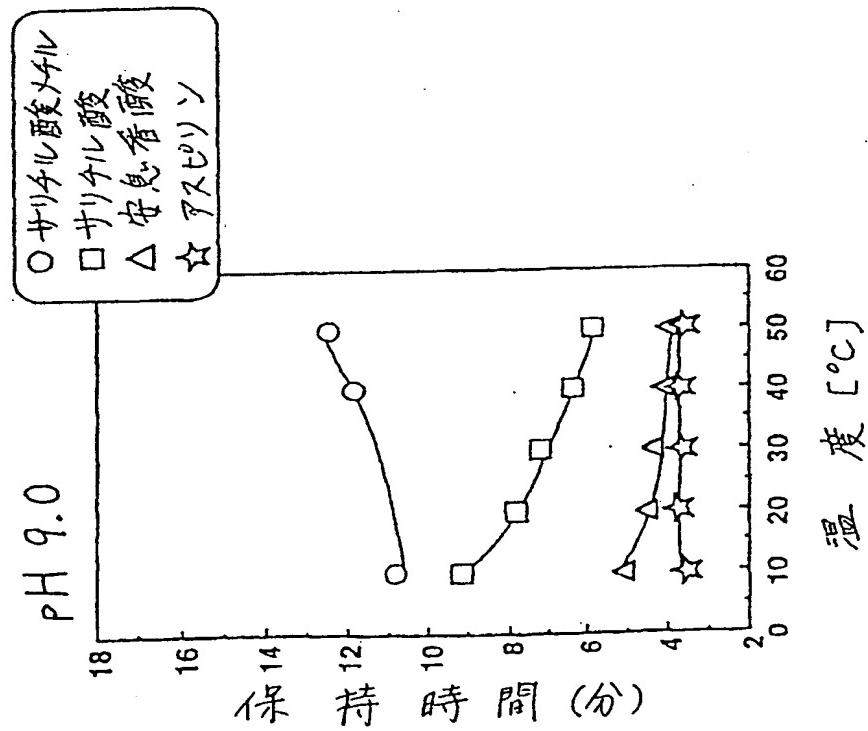
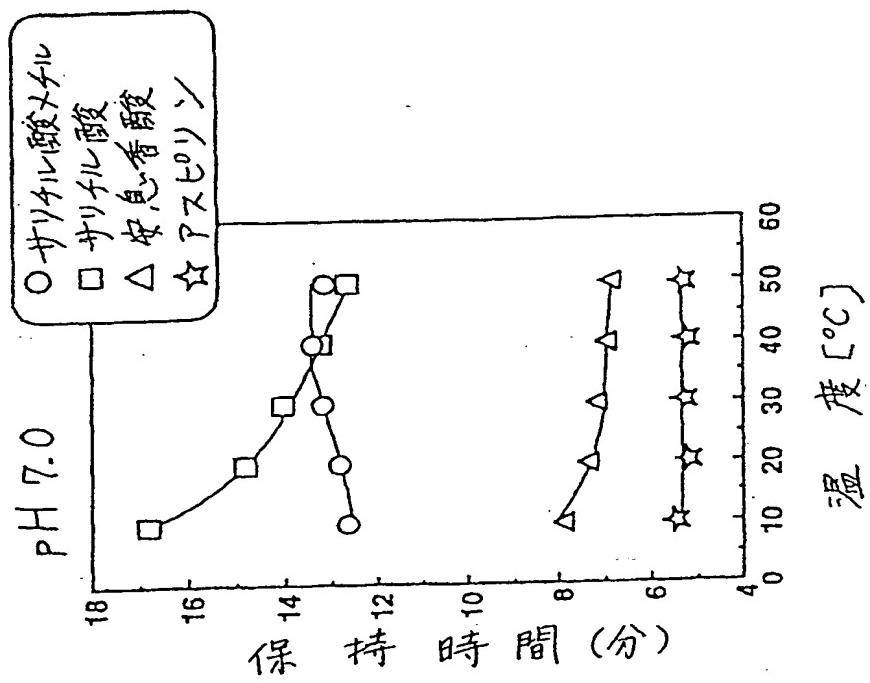


図 3

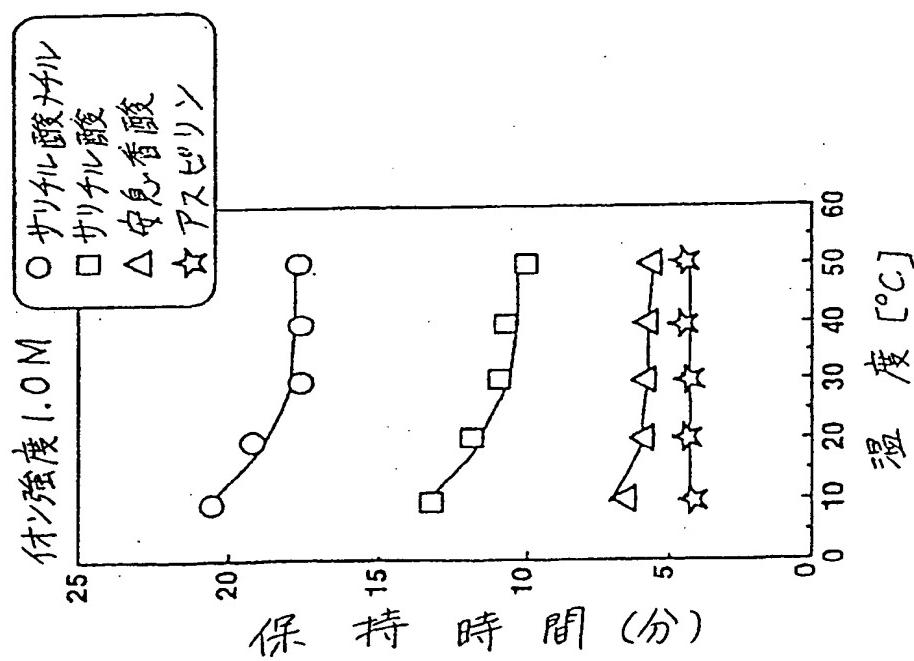
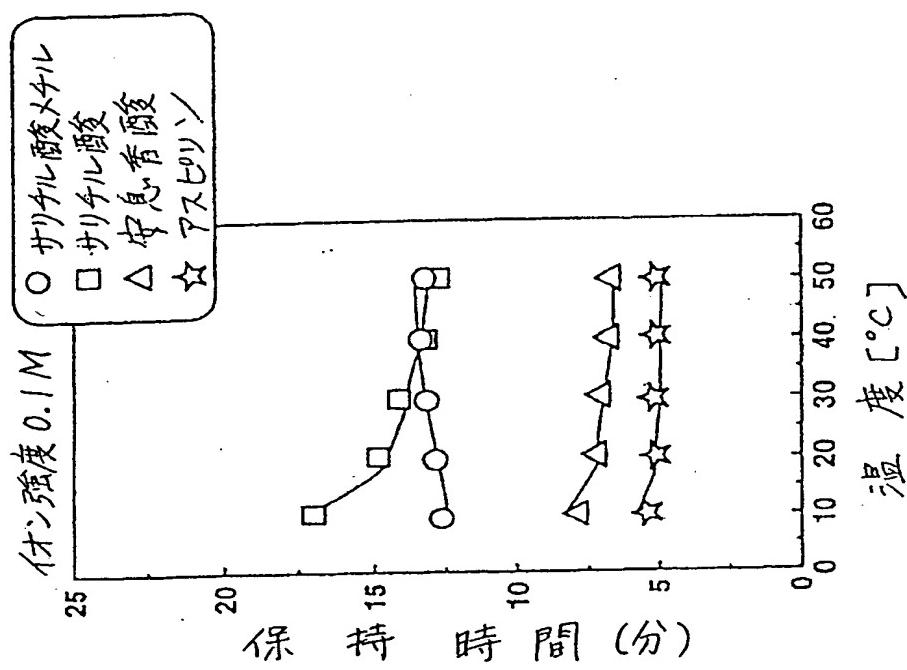
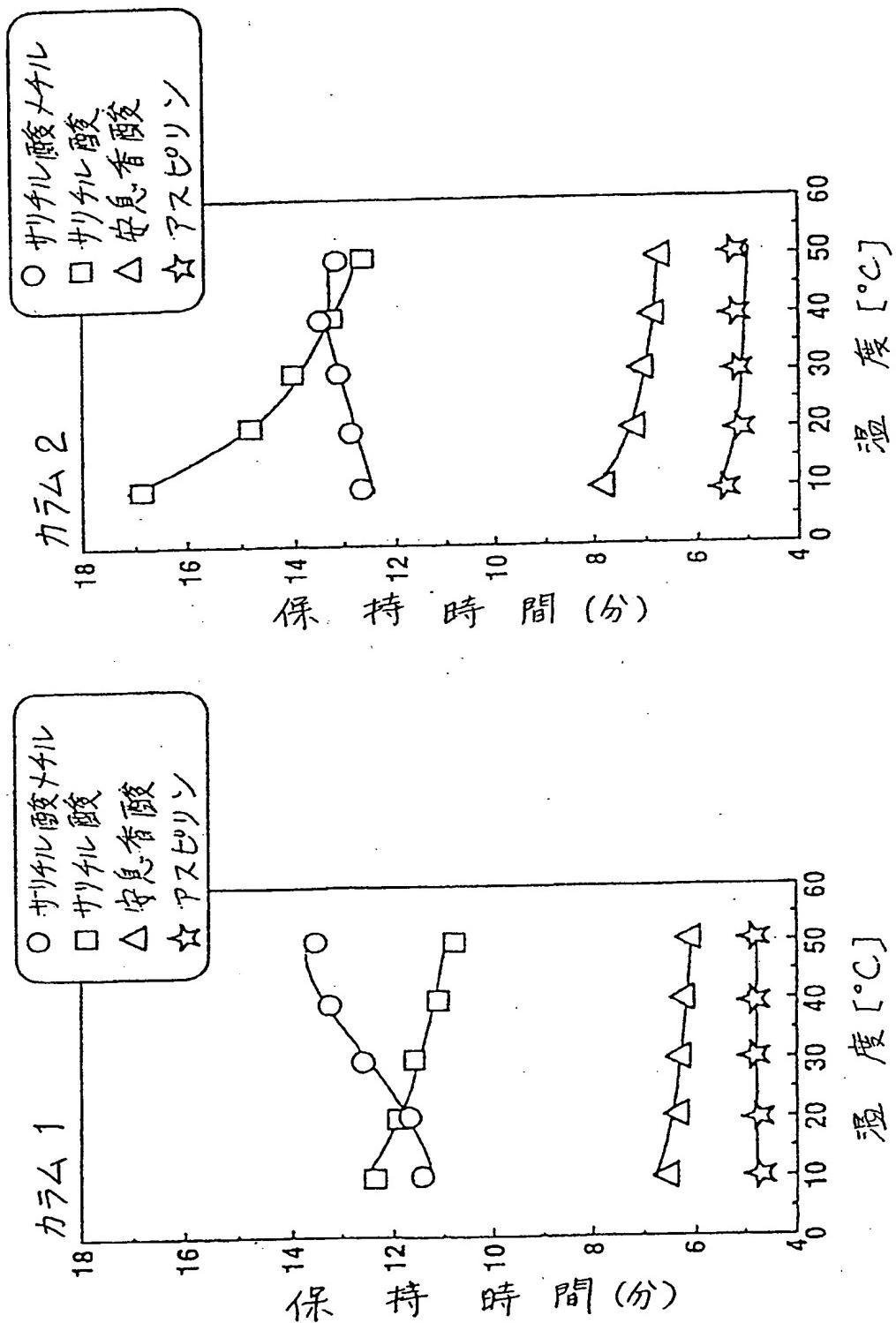


図 4



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02698

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>6</sup> G01N30/48, G01N30/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>6</sup> G01N30/48, G01N30/54Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1926-1999 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 7-318551, A (Research Development Corp. of Japan), 8 December, 1995 (08. 12. 95) (Family: none)	1-14
X	JP, 8-103653, A (Terumo Corp.), 23 April, 1996 (23. 04. 96) (Family: none)	1-14
X	JP, 9-49830, A (Terumo Corp.), 18 February, 1997 (18. 02. 97) (Family: none)	1-14
X	JP, 6-262071, A (Mitsubishi Kasei Corp.), 20 September, 1994 (20. 09. 94) (Family: none)	1-7, 12-14
X	JP, 7-5161, A (Chuichi Hirayama), 10 January, 1995 (10. 01. 95) (Family: none)	1-5, 12, 13
X	Analytical Chemistry, 69(1997), p.823-830	1-7, 12-14
X	Analytical Chemistry, 68(1996), p.100-105	1-7, 12-14
A	Journal of Chromatography A, 776(1997), p.75-80	1-14

 Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier document but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
4 June, 1999 (04. 06. 99)Date of mailing of the international search report  
15 June, 1999 (15. 06. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C14 G01N30/48  
Int. C14 G01N30/54

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C14 G01N30/48  
Int. C14 G01N30/54

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1999年  
日本国公開実用新案公報 1971-1999年  
日本国登録実用新案公報 1994-1999年  
日本国実用新案登録公報 1996-1999年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 7-318551, A(新技術事業団), 8. 12月. 1995(08. 12. 95), (ファミリー無し)	1-14
X	JP, 8-103653, A(テルモ株式会社), 23. 4月. 1996(23. 04. 96), (ファミリー無し)	1-14
X	JP, 9- 49830, A(テルモ株式会社), 18. 2月. 1997(18. 02. 97), (ファミリー無し)	1-14
X	JP, 6-262071, A(三菱化成株式会社), 20. 9月. 1994(20. 09. 94), (ファミリー無し)	1-7, 12-14

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

04. 06. 99

## 国際調査報告の発送日

15.06.99

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩



2 J 9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/02698

C(続き)	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	JP, 7- 5161, A(平山忠一), 10. 1月. 1995(10.01.95), (ファミリー無し)	1-5, 12, 13
X	Analytical Chemistry, <u>69</u> (1997), p. 823-830	1-7, 12-14
X	Analytical Chemistry, <u>68</u> (1996), p. 100-105	1-7, 12-14
A	Journal of Chromatography A, <u>776</u> (1997), p. 75-80	1-14

SPECIFICATION

CHROMATOGRAPHIC PACKING HAVING NOVEL CHARACTERISTICS AND METHOD  
FOR SEPARATING SUBSTANCES BY USING THE SAME

5

Technical Field

This invention relates to a packing which contains a charged (co)polymer and makes it possible to change the effective charge density or hydrophilic/hydrophobic balance on the surface of 10 a stationary phase in an aqueous system by an external signal (for example, temperature), and a novel separation method by which substances such as metal elements, drugs or biological components are chromatographically separated by using the packing.

15

Background Art

There a great variety of liquid chromatography techniques depending on the combination of stationary phase with mobile phase and the interaction systems employed for the separation.

20 Liquid chromatography is a highly important technique for separating metal elements, isolating and purifying drugs and separating peptides, proteins, nucleic acids, etc. in the field of biochemistry. In recent years, moreover, attempts have been made to apply recombinant proteins, etc. produced by 25 bioengineering procedures, which have made remarkable advances, to medicines. Under these circumstances, there is a growing requirement for efficient separation methods for separating and purifying these products. Chromatographic techniques commonly employed at present involve ion-exchange chromatography,

reversed phase chromatography, etc.

In ion-exchange chromatography, separation is carried out by using, as a stationary phase, an electrolyte on the surface of an insoluble carrier and irreversibly adsorbing counter ions contained in the mobile phase. As the carrier, silica, cellulose, dextran, styrene/divinylbenzene copolymer, etc. are widely employed. Carriers having ion-exchange groups (for example, sulfonate, quaternary ammonium) introduced thereinto are commercially available as ion exchangers. Solute dissociate into cations, anions and amphoteric ions depending on the hydrogen ion concentration in the solution. When this solution is passed through an ion-exchange column, each ion binds to the oppositely charged exchange group on the carrier surface competitively with solvent ions, thus causing distribution between the solution and the ion exchanger surface at a certain ratio. The migration rates through the column vary depending on the bond strength and separation is completed by utilizing this difference in the migration rate. The distribution can be modified by some methods. For example, it can be changed by controlling the concentration of the competitive ion species in the mobile phase. Alternatively, the extent of ionization of the ion-exchange group on the carrier surface may be varied by changing the hydrogen ion concentration in the solution. That is to say, it has been a practice in ion-exchange chromatography to separate solutes from each other by controlling the ionic strength or the hydrogen ion concentration in the mobile phase to thereby change the elution order of the solutes.

Reversed phase chromatography involves the use of a combination of a hydrophobic stationary phase and a polar mobile

phase. Solutes are distributed between the mobile phase and the stationary phase depending on the degree of hydrophobicity. In this case, solutes are eluted also by changing the degree of hydrophobicity of the solvent in the mobile phase to thereby 5 change the distribution between the mobile phase and the stationary phase. Since an organic solvent is employed as the solvent in the mobile phase, it is feared that the activities of the biological components to be separated might be caused to deteriorated thereby.

10 In short, solutes are eluted and separated from each other fundamentally by varying the solvent in the mobile phase both in ion-exchange chromatography and reversed phase chromatography. Accordingly, there is a risk that the activity of the target sample might be damaged by an acid or organic 15 solvent employed in the elution.

When it is intended to separate substances from each other by two or more chromatographies, each chromatography should be independently carried out, since chromatographic mode varies from carrier to carrier. If it is possible to perform ion- 20 exchange chromatography and reversed phase chromatography by using a single carrier and a single physical stimulus, separation could be completed at an elevated efficiency within a shorter period of time. Moreover, substances which cannot be separated from each other by the conventional techniques can be separated 25 thereby.

There are a great variety of biological components including charged ones and uncharged ones. In general, a compound capable of being ionized is retained, in an unionized state, in a hydrophobic packing owing to hydrophobic interaction.

When ionized, however, the hydrophobic interaction with the hydrophobic packing is weakened. Ion-dissociatable compounds differing in the dissociation constant can be easily separated from each other owing to the ion-ion interaction with the use  
5 of an ion exchanger.

It is generally known that weakly acidic ion exchange resins and weakly basic ion exchange resins are suitable respectively for separating basic proteins and acidic proteins. It is thus expected that, by introducing ion-exchange substituents,  
10 ion-exchange chromatography based on ion-ion interactions becomes usable in separating various substances, which are similar to each other in hydrophobicity or molecular weight and thus cannot be separated exclusively by hydrophobic interactions, and biological molecules such as proteins and  
15 nucleic acid oligomers.

However, there has been known hitherto neither any carrier which is usable both in ion-exchange chromatography and reversed phase chromatography when employed alone under one physical stimulus nor one usable in efficiently separating various  
20 substances, which are similar to each other in hydrophobicity or molecular weight and thus cannot be separated exclusively by hydrophobic interactions, and biological molecules such as proteins and nucleic acid oligomers.

25 Disclosure of Invention

To solve the above-mentioned problems, the present inventors have conducted studies and developments from various viewpoints. As a result, they have successfully prepared a novel packing having ion-exchange function by copolymerizing

poly(N-isopropylacrylamide) (PIPAAm) with positively charged dimethylaminopropylacrylamide (DMAPAAm) and found that this packing is usable both in reversed phase chromatography and ion-exchange chromatography, when temperature is properly controlled. They have furthermore found that use of the charged copolymer makes it possible to control the LCST of the polymer by regulating pH value. The present invention has been completed based on these findings.

The present invention relates to a method for separating substances characterized by chromatographically separating said substances with the use of a packing which contains a charged (co)polymer and makes it possible to change the effective charge density on the surface of a stationary phase by an external stimulus while fixing a mobile phase to an aqueous system.

The present invention further relates to a method for separating substances characterized by retaining the substances in a stationary phase made of a chromatographic packing chemically modified with a polyalkylacrylamide copolymer having amino, carboxyl, hydroxyl groups, etc., then changing the hydrophilic/hydrophobic balance on the surface of the stationary phase by the temperature gradient method wherein the external temperature is changed stepwise, and passing the substances through a single mobile phase to thereby separate the same.

The present invention furthermore relates to a chromatographic packing which contains a charged (co)polymer and makes it possible to change the effective charge density on the surface of a stationary phase by a physical stimulus.

In the chromatographic packing of the present invention,

the charged state of ion-exchange groups on the surface of a carrier can be reversibly controlled by changing the surface structure of the stationary phase by an external physical stimulus such as a change in temperature. Namely, the present

5 invention provides a stationary phase which makes it possible to perform two chromatographic modes, i.e., ion-exchange chromatography and reversed phase chromatography, at the same time with the use of a mobile phase which is a single aqueous solvent (aqueous mobile phase). Moreover, the present

10 invention provides a carrier capable of arbitrarily controlling the charge of ion-exchange groups on the surface of the carrier (in the case of ion-exchange chromatography) or the hydrophilic/hydrophobic balance (in the case of the reversed phase chromatography). The term "aqueous solvent" as used

15 herein means water alone or aqueous solutions containing inorganic salts but free from any organic solvent.

The present invention provides a carrier for separation and purification characterized in that separation is performed by controlling the charge of ion-exchange groups on the surface

20 of the stationary phase by regulating the physical properties or structure around the ion exchange groups on the carrier surface by a physical stimulus, while fixing the mobile phase to an aqueous system. According to the present invention, when the external temperature is lower than the critical temperature,

25 the ion-exchange groups appear on the surface of the carrier. Then the biological components to be separated undergo interaction with the ion-exchange groups followed by separation by the ion-exchange chromatography mode. When the external temperature is higher than the critical temperature, on the other

hand, the surface charge is weakened and the carrier becomes more hydrophobic. Then, the biological components can be separated by the reversed phase chromatography mode. That is to say, the hydrophilic/ hydrophobic balance on the surface of 5 the carrier can be reversibly and arbitrarily changed by controlling the external temperature.

Brief Description of Drawings

Fig. 1 provides graphs showing the relationship between 10 temperature and retention time in the separation of aspirin, salicylic acid, methyl salicylate and benzoic acid with the use of two packings described in Example 2.

Fig. 2 provides graphs showing the relationship between 15 temperature and retention time in the separation of aspirin, salicylic acid, methyl salicylate and benzoic acid while changing pH value in Example 3.

Fig. 3 provides graphs showing the relationship between 20 temperature and retention time in the separation of aspirin, salicylic acid, methyl salicylate and benzoic acid while changing ionic strength in Example 4.

Fig. 4 provides graphs showing the relationship between 25 temperature and retention time in the separation of aspirin, salicylic acid, methyl salicylate and benzoic acid while changing the polymerization ratio of IPAAm to DMAAAm in Example 5.

Best Mode for Carrying Out the Invention

The external physical signal to be used in the method of the present invention is exemplified by a change in temperature.

To alter the physical properties or structure around ion-exchange groups on the surface of the packing by changing temperature, for example, a temperature-responsive polymer may be introduced into the surface of the carrier. Examples of packings of this type include chromatographic packings chemically modified on the surface of the carrier with alkylacrylamide polymers or copolymers having amino, carboxyl, hydroxyl groups, etc. in the side chains or at the ends. Chemically modified packings are exemplified by silica carriers modified with the above-mentioned alkylacrylamide polymers or copolymers. To introduce ion-exchange groups, carriers may be chemically modified by copolymers of the above-mentioned alkylacrylamides with comonomers having amino or carboxy groups.

Examples of the constitutional units of amino-containing polymers include dialkylaminoalkyl(meth)acrylamide, dialkylaminoalkyl (meth)acrylate, aminoalkyl (meth)acrylate, aminostyrene, aminoalkylstyrene, aminoalkyl(meth)acrylamide, alkyloxyalkyltrimethylammonium salts and (meth)acrylamido-alkyltrimethylammonium salts. Examples of the constitutional units of carboxyl-containing polymers include acrylic acid and methacrylic acid, while examples of the constitutional units of the sulfonate-containing polymers include (meth)acrylamido-alkylsulfonic acid.

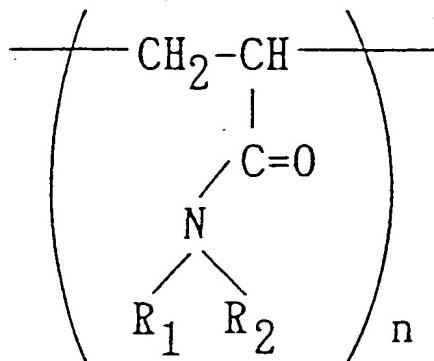
It is preferable that the polyalkylacrylamide to be used in the present invention is selected from among poly(N-isopropylacrylamide), polydiethylacrylamide, poly(N-propylacrylamide) and polyacryloylpiperidone and copolymers of the constitutional units of these polymers with alkyl

(meth)acrylate, as shown by the following formulae.

[Chemical formula 1]

Polyalkylacrylamide

5

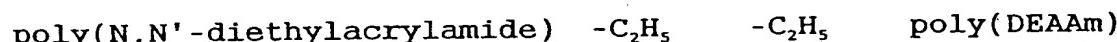
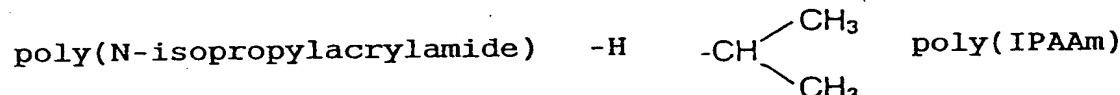


10

15

 $R_1$  $R_2$ 

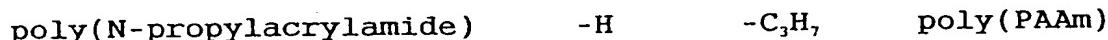
Abbreviation



20



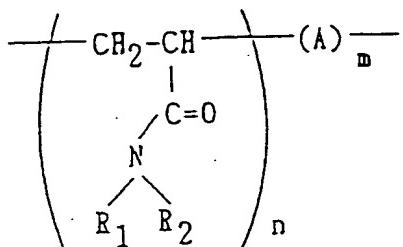
25



## [Chemical formula 2]

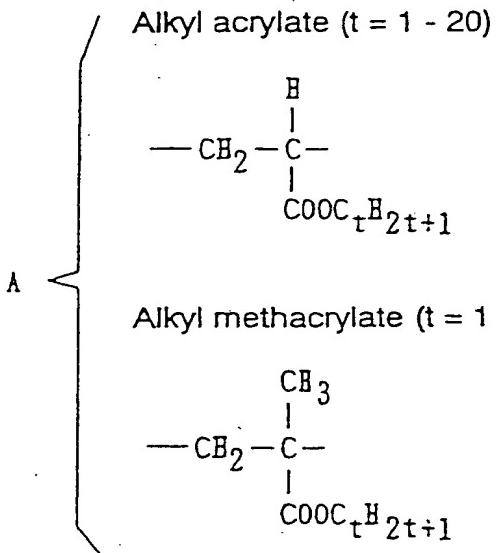
## Copolymer

5



A: content: 50 - 60 %

10



15

Since poly(N-isopropylacrylamide) has a lower limit of critical temperature of 32 °C, a carrier chemically modified therewith undergoes a large change in the hydrophilic/hydrophobic surface properties at this critical temperature. When the surface of a chromatographic packing is grafted or coated with this polymer, the power of retaining a sample varies depending on temperature. Thus, the retention behavior can be regulated by controlling temperature without changing the composition of the eluate. A lower limit of critical temperature of 32 °C or above can be achieved by copolymerizing the N-isopropylacrylamide with comonomers which are more

hydrophilic than isopropylacrylamide, for example, acrylamide, methacrylic acid, acrylic acid, dimethylacrylamide and vinyl pyrrolidone. On the other hand, a lower limit of critical temperature lower than 32 °C can be achieved by copolymerizing 5 the N-isopropylacrylamide with hydrophobic comonomers, for example, styrene, alkyl methacrylate and alkyl acrylate.

The lower limit of critical temperature of polydiethylacrylamide is about 30 to 32 °C. At this temperature, this polymer undergoes a change in the surface 10 hydrophilic/hydrophobic nature. Similar to the above-mentioned case of poly(N-isopropylacrylamide), the power of retaining a sample can be thus regulated by controlling temperature. The novel chromatographic carrier to be used in the present invention is prepared by chemically modifying or 15 coating the carrier with a polymer. The chemical modification can be carried out by two methods, i.e., surface grafting and radical polymerization. In the case of coating, on the other hand, the polymer is insolubilized within the application temperature range and then the insolubilized product is employed 20 in coating.

As described above, surface grafting and radical polymerization can be employed as the chemical modification means by which a temperature-responsive polymer is introduced into a carrier. In the surface grafting method, a 25 temperature-responsive polymer of a definite size is first synthesized and then grafted to the carrier. In the radical polymerization method, in contrast thereto, monomer(s) are polymerized on the surface of the carrier to give a polymer. Compared with the surface grafting method, the radical

polymerization method makes it possible to introduce the temperature-responsive polymer into the surface of the carrier at a high density. Thus, the hydrophobicity of the surface of the carrier can be elevated and the retention time can be easily controlled. In this case, moreover, non-specific adsorption on the carrier surface due to the interaction with silica gel can be easily suppressed.

Substances which can be separated by the method of the present invention include metal element ( $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , etc.), drugs (steroids, antipyretic analgesic agents, etc.) and biological components (peptides, proteins, nucleic acids, etc.). The method of the present invention is particularly useful in separating various biological components which cannot be separated by using either ion-exchange chromatography or reversed phase chromatography alone.

#### Examples

To further illustrate the present invention in greater detail, and not by way of limitation, the following Examples will be given.

##### [Example 1]

###### 1. Synthesis of polymer

1-1) Poly(IPAAm-DMAPAAm) (DMAPAAm:N,N-dimethylaminopropyl-acrylamide)

25 1-1-a) Preparation of IPAAm copolymer having carboxyl end

An IPAAm copolymer having a carboxyl end was synthesized in such a manner as to give a molecular weight of 4,000 as a standard. The molecular weight of the polymer can be designed by controlling the amount of 3-mercaptopropionic acid (MPA)

employed as a chain transfer agent. To prepare a copolymer having a molecular weight of 4,000, the amount of MPA was regulated so as to give a molar ratio MPA/(IPAAm + DMAPPAm) of 0.028.

5	Purified monomer IPAAm :	25.0 g.
	Cationic monomer (5 % by mol of DMAPPAm based on IPAAm) :	1.72 g.
	Radical polymerization initiator [2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN) :	0.145 g.
10	Chain transfer agent (3-mercaptopropionic acid):	0.691 g.
	DMF (N,N-dimethylformamide) :	50 ml.

The above components were fed into a polymerization tube and fixed with a rubber ring provided with a three-way stopcock. The polymerization tube was introduced into liquid nitrogen, while closing the cock, and completely frozen. Next, the cock was opened and the contents of the tube were degassed by using a vacuum pump. After closing the cock again, the polymerization tube was introduced into methanol and the sample in the tube was completely dissolved. This procedure was repeated thrice (freezing/thawing degassing method). Then the polymerization tube containing the completely degassed sample under reduced pressure was introduced into a thermostat under shaking at 70 °C and radical polymerization was performed for 2 hours to thereby synthesize a copolymer having a carboxyl group at one end. After the completion of the reaction, the reaction mixture was cooled to room temperature by allowing to stand. Then the solvent (DMF) was concentrated by distilling at 40 °C under reduced pressure and the residue was dropped into ice-cooled diethyl ether to thereby give a polymer. The polymer thus obtained was taken up

by filtration and dried at ordinary temperature under reduced pressure overnight. The dried product was dissolved in acetone and purified again with diethyl ether. The polymer thus obtained was taken up again by filtration and dried at ordinary 5 temperature under reduced pressure overnight. The obtained polymer was then dissolved in purified water to give a 5 % (w/v) solution. The resultant solution was transferred onto a dialysis membrane of a fractional molecular weight of 500 and dialyzed for 3 days. Thus a highly pure copolymer having a 10 uniform molecular weight could be obtained.

1-1-b) Introduction of IPAAm copolymer into carrier

(a) Active esterification (succinylation) method

To succinylate the copolymer synthesized above, the molar ratio of the copolymer : N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) : 15 N-hydroxysuccinimide was adjusted to 1 : 2.5 : 2.

The copolymer was fed into a round-bottomed flask and dissolved in a half amount (25 to 30 mL) of ethyl acetate. Next, N-hydroxysuccinimide and DCC were added thereto followed by dissolution in the residual ethyl acetate. The obtained mixture 20 was immersed in ice-water at 4 °C and stirred with a stirrer for 2 hours. Subsequently, it was introduced into a thermostat at 25 °C and stirred therein overnight. The solution was filtered and thus dicyclohexyl urea formed as a by-product was removed therefrom. After concentrating under reduced pressure, the 25 residue was purified with diethyl ether. The product thus obtained was taken up by filtration and dried under reduced pressure. The succinylated copolymer thus obtained was stored in a freezer.

1-1-c) Introduction into carrier (silica gel)

The succinylated copolymer was reacted in three portions with aminopropyl silica gel with the use of 1,4-dioxane as a solvent. The reaction was carried out at room temperature (25 °C). First, the succinylated polymer (1.0 g) was dissolved in 5 1,4-dioxane (50 mL) and reacted with aminopropyl silica gel (3 g) in a thermostat under shaking overnight. Subsequently, the liquid reaction mixture was filtered and the precipitate thus obtained and fresh copolymer (1.0 g) were dissolved in 1,4-dioxane (50 mL) again and reacted overnight. After repeating 10 this procedure once again, the product finally taken up by filtration was sufficiently washed with methanol (500 mL) and distilled water (2 mL), dried under reduced pressure and then stored in a desiccator as a packing.

15 [Example 2]

1-2) Preparation of PIPAAm hydrogel surface

1-2-a) Formation of gel layer on aminopropyl silica gel  
surface

To introduce a polymerization initiator into aminopropyl 20 silica gel, the following compounds were used.

	Aminopropyl silica gel :	5 g.
	V-501 :	3.5 g (12.5 mmol).
	EEDQ :	6.18 g (25.0 mmol).
25	DMF :	50 ml.

Use was made of V-501 [4,4'-azobis(4-cyanovaleic acid) (molecular weight: 280.28)] as a polymerization initiator and EEDQ [N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline,

molecular weight: 247.30] as a condensing agent each in the amount as specified above. These compounds were reacted with aminopropyl silica gel in DMF. After bubbling N<sub>2</sub> gas thereinto in the dark for 30 minutes, the reaction vessel was completely charged with N<sub>2</sub> and reaction was carried out by using an N<sub>2</sub> balloon at room temperature for 6 hours. After the completion of the reaction, the mixture was filtered and washed with DMF. Thus, the polymerization initiator had been introduced into the surface of the aminopropyl silica gel.

10 1-2-b) Formation of surface gel layer

	Silica gel having V-501 bonded thereto prepared in above 1-2-a):	4 g.
	IPAAm : 10 g.	
15	BIS : 0.27 g.	
	EtOH : 200 ml.	
	DMAPAAm : such an amount as to give a molar ratio to IPAAm of 8 : 2 or 9 : 1.	

20 Silica gel, IPAAm, DMAPAA and BIS [N,N'-methylene-bis (acrylamide), molecular weight: 154.17] were dissolved in ethanol. After bubbling N<sub>2</sub> gas thereinto in the dark for 1 hour, the reaction vessel was completely charged with N<sub>2</sub> and reaction was carried out in an oil bath at 70 °C by using an N<sub>2</sub> balloon for 5 hours, thus forming a gel layer on the surface of PIPAAm. After the completion of the reaction, the mixture was filtered and washed with methanol and water. The obtained product was dried under reduced pressure and stored in a desiccator as a packing. It was packed into a stainless column and employed in

analysis.

[Example 3]

Aspirin, salicylic acid, methyl salicylate and benzoic acid were separated under the following conditions by using columns packed with a positively charged gel (IPAAm : DMAAPAAm = 8 : 2) and IPAAm hydrogel.

Separation conditions

Column : (1) packed with poly(IPAAm) hydrogel-modified silica;  
10 (2) packed with poly(IPAAm-co-DMAAPAAm) (8 : 2)  
hydrogel-modified silica.

Buffer : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>.

pH = 9.0.

15 Ionic strength = 0.1 M.

Fig. 1 shows the results. Aspirin could not be separated from benzoic acid by using the column packed with the IPAAm hydrogel. In contrast, these compounds could be separated from each other by using the column packed with the positively charged 20 gel (IPAAm : DMAAPAAm = 8 : 2). At 10 °C, in particular, all of the four compounds including charged and uncharged ones could be separated from each other within a short period of time of about 20 minutes. The order of separation depended on the hydrophobicity degrees of these compounds. In the cases of 25 salicylic acid and benzoic acid, the retention times were shortened as temperature was elevated. This is seemingly because, when temperature was elevated, the structure and physical properties of the temperature-responsive polymer were changed and the charge on the carrier surface was thus lowered

so as to reduce the interactions between the surface and the solutes. On the contrary, methyl salicylate (i.e., an uncharged compound) showed an prolonged retention time as temperature was elevated. This is seemingly because the temperature-responsive 5 polymer became hydrophobic due to increase in temperature.

[Example 4] Effects of pH change

Aspirin, salicylic acid, methyl salicylate and benzoic acid were separated by the same method as the one of Example 10 3 but using the column packed with poly(IPAAM-co-dMAPAAm) (8 : 2) hydrogel-modified silica of Example 3 and NaHPO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> [citric acid·H<sub>2</sub>O (monohydrate)] as a buffer at pH 7.0. Fig. 2 shows the results.

Fig. 2 indicates that the retention times of all of the 15 substances were prolonged at pH 7.0, compared with at pH 9.0. This is seemingly because anionic compounds would undergo stronger interactions with the positively charged carrier surface at pH 7.0. These results suggest that the retention times of substances to be separated can be controlled by 20 regulating pH value.

[Example 5] Effects of ionic strength

Aspirin, salicylic acid, methyl salicylate and benzoic acid were separated by using a column packed with the 25 poly(IPAAM-co-DMAPAAm) (8 : 2) hydrogel-modified silica of Example 3 under the following separation conditions.

Separation conditions

Buffer : NaHPO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.

pH = 7.0.

Ionic strength = 1.0 M and 0.1 M.

Fig. 3 shows the results. As the ionic strength was elevated ( $0.1\text{ M} \rightarrow 1.0\text{ M}$ ), the retention times of all of the compounds but the uncharged methyl salicylate were shortened, 5 while the retention time of methyl salicylate was prolonged.

This is seemingly because, when the ionic strength was elevated, the protonation of amino groups on the surface of the carrier was suppressed and the positive charge was lowered, which weakened the interactions of the carrier surface with the anionic 10 compounds. In the case of methyl salicylate, the hydrophobicity was elevated with an increase in the ionic strength and, in its turn, the hydrophobic interaction was seemingly strengthened.

15 [Example 6] Effect of polymerization ratio of IPAAm to DMAPAAm  
Aspirin, salicylic acid, methyl salicylate and benzoic acid were separated under the following conditions.

Separation conditions

Column : (1) packed with poly(IPAAm-co-DMAPAAm) (9 : 1)  
20 hydrogel-modified silica;  
(2) packed with poly(IPAAm-co-DMAPAAm) (8 : 2)  
hydrogel-modified silica.

Buffer :  $\text{NaHPO}_4/\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ .

pH = 7.0.

25 Ionic strength = 0.1 M.

Fig. 4 shows the results. The retention times were prolonged with an increase in the ratio of the positively charged polymer, which indicates that retention time can be controlled by regulating the polymerization ratio.

Industrial Applicability

The present invention has the following advantages.

- 1) The charge of an ion exchanger exposed on the surface of the carrier can be arbitrarily controlled by regulating 5 temperature. Thus separation can be performed in a single aqueous mobile phase without changing the solvent in the mobile phase.
- 2) Due to differences in hydrophobicity and ionic properties, separation can be carried out by a single operation. 10 Compared with the conventional methods wherein two separating operations are needed, therefore, the method of the present invention is a highly efficient one and gives an elevated yield.
- 3) The method of the present invention makes it possible to separate biological components which cannot be separated by 15 either ion-exchange chromatography or reversed phase chromatography employed alone.
- 4) Since neither any acid nor organic solvent is used in the method of the present invention, biological components can be separated without deteriorating their activities.
- 20 5) Compared with the conventional ion exchangers, the packing of the present invention can be quickly regenerated.

Claims

1. A method for separating substances characterized by chromatographically separating said substances with the use of a packing which contains a charged (co)polymer and makes it possible to change the effective charge density on the surface of a stationary phase by a physical stimulus while fixing a mobile phase to an aqueous system.  
5
2. The separation method as claimed in Claim 1, wherein said physical stimulus is a change in temperature.  
10
3. The separation method as claimed in Claim 2, wherein said packing is a chromatographic packing chemically modified on the surface of a carrier with a temperature-responsive polymer.
4. The separation method as claimed in Claim 3, wherein said packing is a chromatographic packing chemically modified with a temperature-responsive polymer by using the radical polymerization method.  
15
5. The separation method as claimed in Claim 3 or 4, wherein said temperature-responsive polymer, with which the surface of the carrier is chemically modified, is a polyalkylacrylamide polymer or copolymer having amino, carboxyl, hydroxyl groups, etc. in the side chains or at the ends.  
20
6. The separation method as claimed in Claim 5, wherein said polyalkylacrylamide is one selected from among poly(N-isopropylacrylamide), poly(N-propylacrylamide), polydiethylacrylamide and polyacryloylpiperidone.  
25
7. The separation method as claimed in any of Claims 1 to 6, wherein said substances are those selected from among metal elements, drugs and biological components.

8. A method for separating substances characterized by retaining the substances in a stationary phase made of a chromatographic packing chemically modified with a polyalkylacrylamide copolymer having amino, carboxyl, hydroxyl groups, etc., then changing the hydrophilic/hydrophobic balance on the surface of the stationary phase by the temperature gradient method wherein the external temperature is changed stepwise, and passing the substances through a single mobile phase to thereby separate the same.
- 5 9. The separation method as claimed in Claim 8, wherein said mobile phase is an aqueous solvent.
10. The separation method as claimed in Claim 8 or 9, wherein said polyalkylacrylamide is one selected from among poly(N-isopropylacrylamide), poly(N-propylacrylamide),
- 15 polydiethylacrylamide and polyacryloylpiperidone.
11. The separation method as claimed in any of Claims 8 to 10, wherein said substances are those selected from among metal elements, drugs and biological components.
12. A chromatographic packing which contains a charged (co)polymer and makes it possible to change the effective charge density on the surface of a stationary phase by a physical stimulus.
- 20 20. The chromatographic packing as claimed in Claim 12, wherein said (co)polymer is a polyalkylacrylamide copolymer having amino, carboxyl, hydroxyl groups, etc.
- 25 13. The chromatographic packing as claimed in Claim 12 or 13, wherein said polyalkylacrylamide is one selected from among poly(N-isopropylacrylamide), poly(N-propylacrylamide), polydiethylacrylamide and polyacryloylpiperidone.
14. The chromatographic packing as claimed in Claim 12 or 13,

Abstract

[Abstract]

[Object] To provide chromatographic packings whereby  
5 biological components, etc. which cannot be separated by either  
ion-exchange chromatography or reversed phase chromatography  
employed alone can be efficiently separated without  
deteriorating their activities.

[Means for solution] Use is made of a packing which contains  
10 a charged copolymer and makes it possible to change the effective  
charge density on the surface of a stationary phase by a physical  
stimulus while fixing a mobile phase to an aqueous system.

[Selected figure] None.

Fig. 1

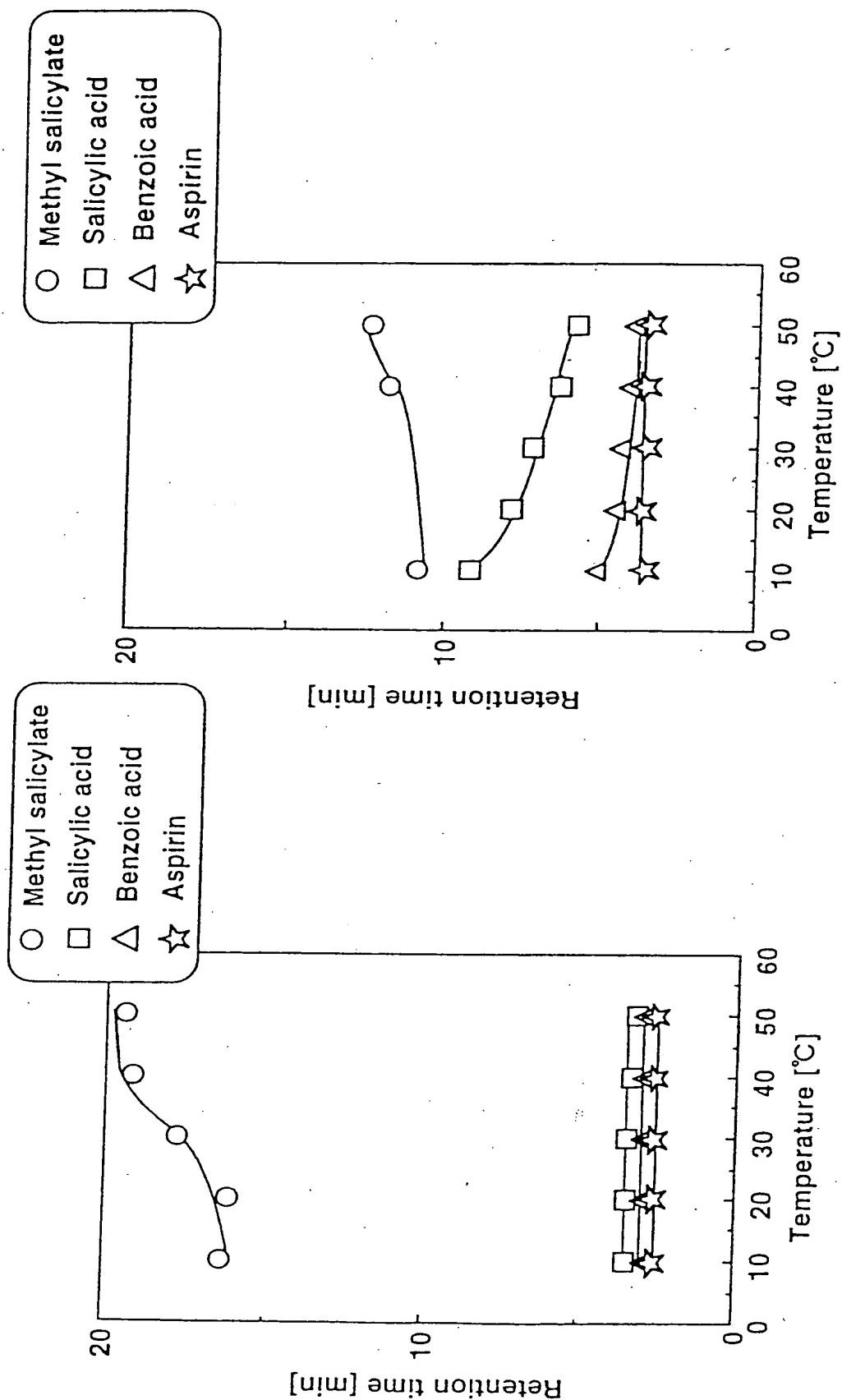


Fig. 2

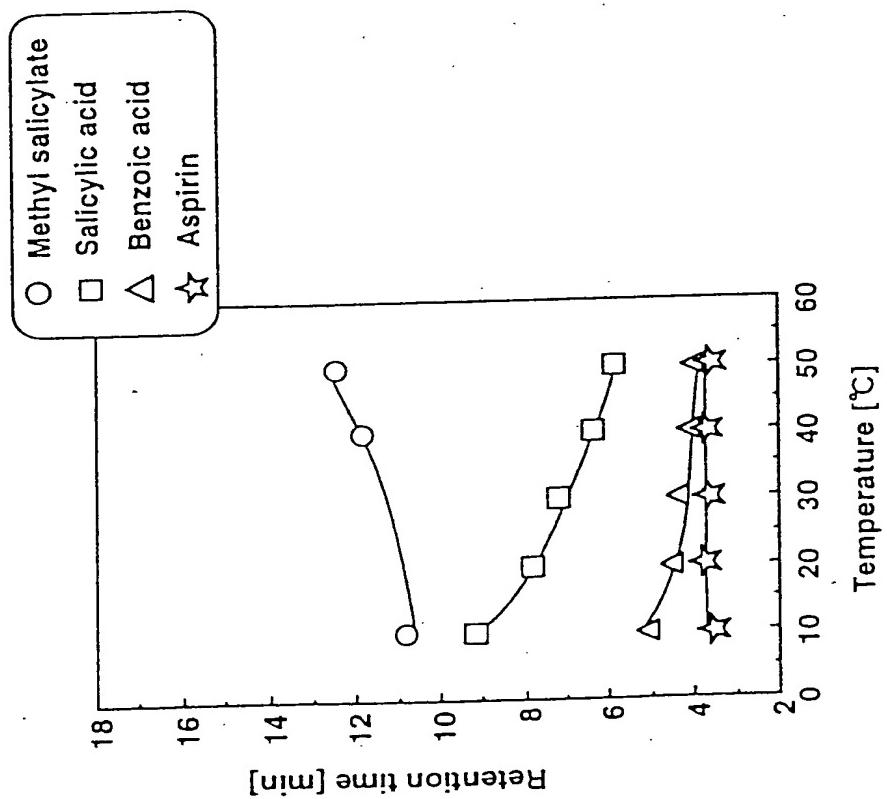
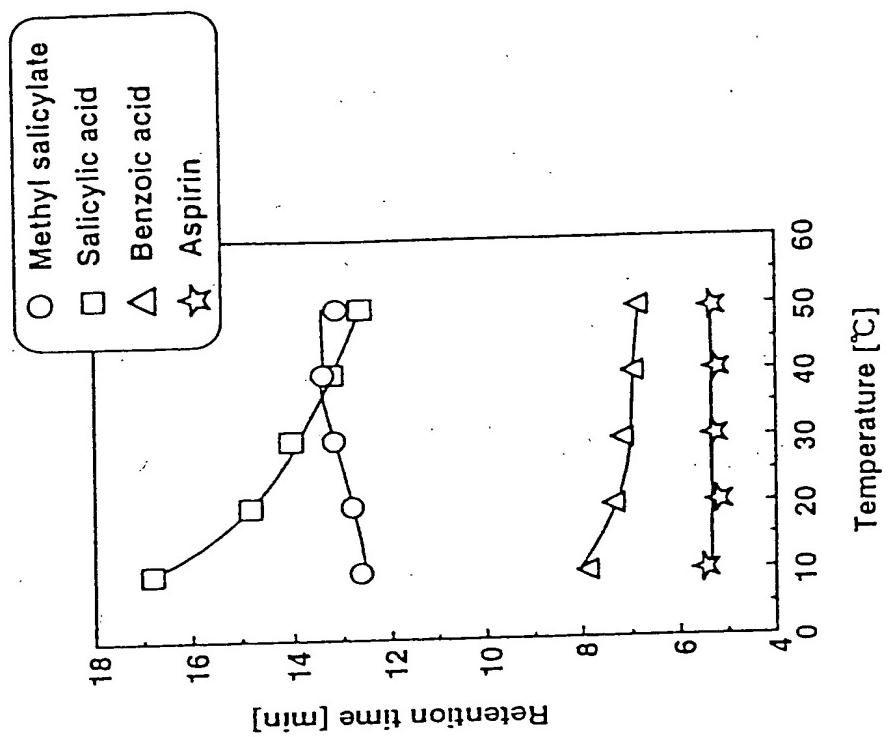


Fig. 3

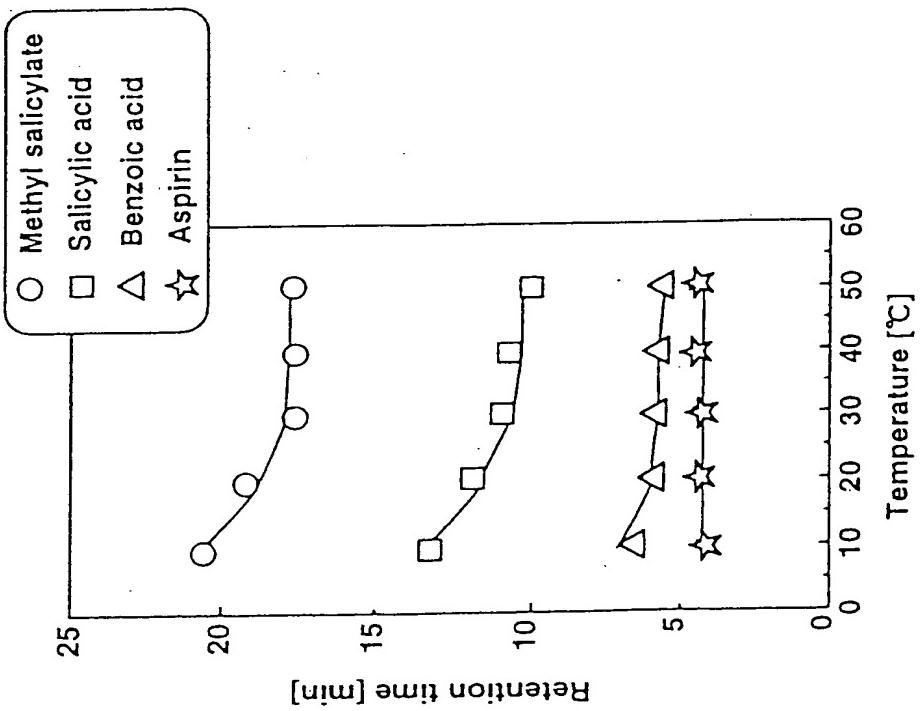
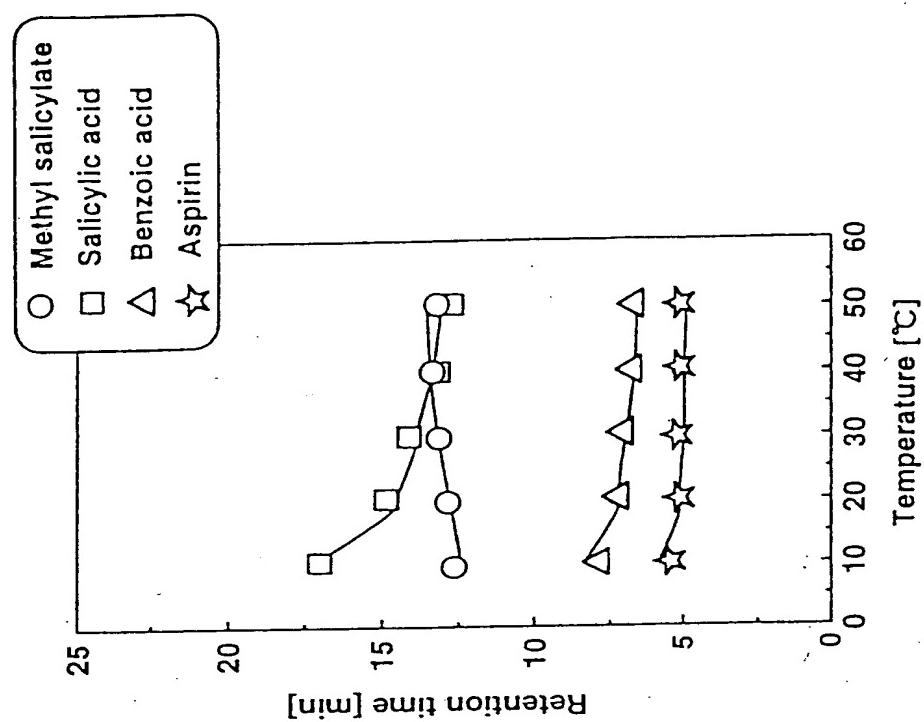


Fig. 4

